

Verfahren zum Nachweis posttranslationaler Modifizierungsaktivitäten und Gerätesysteme zur Realisierung des Verfahrens

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum qualitativen Nachweis posttranslationaler Modifizierungsaktivitäten, das heißt den Nachweis der enzymatischen Aktivitäten die durch Bildung spezifischer Gruppen, wie die Phosphat-Gruppe, die bereits synthetisierten Proteine modifizieren und deren Funktion verändern.

Die Ursache für die Entstehung gravierender Krankheiten, wie Krebs, Diabetes, Arthritis, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Bluthochdruck und Schlaganfälle sind veränderte Protein-Aktivitäten. Die Erfindung stellt ein schnelles, hochsensibles und effizientes Verfahren zum Nachweis der verschiedenen Typen der posttranslationalen Aktivitäten dar. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren und den Gerätesystemen wird im Bereich der biologischen Multidetektionssysteme ein wesentlicher Beitrag zum Hochdurchsatz erforderlicher Tests geleistet.

Bevor zum Stand der Technik nähere Ausführungen erfolgen, soll einleitend festgestellt werden:

Systeme und Methoden zum schnellen Nachweis von Analyten mit biologischen Aktivitäten, insbesondere in kleinen flüssigen Proben, haben eine hohe medizinische und pharmazeutische Bedeutung sowie Bedeutung im Umweltschutz. Eine der umfassendsten und bedeuteinsten Gruppen der zellulären Aktivitäten, die für die Pharmaka-Entwicklung besonders wichtig sind, sind die Aktivitäten, die in der posttranslationalen Modifizierung wirken. Die Folgen dieser Aktivitäten, die für jede lebende Zelle charakteristisch sind, sind die veränderten funktionellen Eigenschaften der modifizierten Eiweiße (Proteine). Die Hauptmechanismen der posttranslationalen Modifizierung der Proteine oder Polypeptide sind Phosphoryllierung, Metilierung, Prenilierung, Ubiquitinierung und Proteolyse. Verschiedene externe Bedingungen (Stimuli), wie Anwesenheit von Wachstumsfaktoren oder Entwicklung von pathologischen Zuständen, wie Veränderungen in Zellzyklus und Wirkung von Toxinen, können vorübergehend den posttranslationalen Zustand mehrerer intrazellulärer Komponenten verändern. Deshalb ist die schnelle Entwicklung von spezifischen und effektiven Hemmern oder Aktivatoren von bestimmten posttranslationalen Aktivitäten notwendig. Insofern ist die Entwicklung von entsprechenden Proben und Verfahren wichtig, die einen zuverlässigen und

empfindlichen Nachweis dieser Aktivitäten in Multidetektionssystemen (Microarrays, Biochips) ermöglichen.

Als Beispiel einer posttranslationalen Modifizierung dient die Phosphoryllierung-Dephosphoryllierung der Proteine durch Kinasen und Phosphatasen. Die Kinasen modifizieren die Proteine durch Bindung einer Phosphatgruppe (Phosphoryllierung) zu Aminosäure Reste, überwiegend Serin, Threonin oder Tyrosin. Im Gegensatz dazu entfernen Proteine Phosphatasen, diese Phosphatgruppen kehren damit den Phosphoryllierungseffekt um. Die Veränderungen im Phosphoryllierungszustand der Proteine regulieren enzymatische Aktivitäten durch Lokalisierung und molekulare Wechselwirkungen zwischen Proteinen in den lebenden Zellen. Die allgemeine Balance von Kinasen- und Phosphatasen-Aktivitäten in einer Zelle ist Grundlage des Proteinphosphoryllierungszustandes zu jedem Zeitpunkt. Die Wirkung von Protein Kinasen und Phosphatasen gehört allgemein betrachtet zu den wichtigsten regulatorischen Mechanismen der Protein-Funktionen. Die neusten Erkenntnisse und Analysen von Krankheiten, die auf genetische Defekte von Protein Kinasen hinweisen, deuten auf über 400 spezifische Krankheitszustände hin, die mit veränderten Aktivitäten der Kinasen selbst in Verbindung zu sehen sind.

Da die abnormale Proteinphosphoryllierung Ursache für die Entstehung gravierender Krankheiten wie Krebs, Diabetis, Arthritis, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Bluthochdruck und Schlaganfälle ist, sind für die pharmazeutische Industrie neue Verbindungen von Interesse, die in der Lage sind, Phosphoryllierungsaktivitäten der Protein Kinasen zu hemmen.

Um neue effektive Pharmaka zu entwickeln, müssen große Mengen von Verbindungen, die mit Hilfe von kombinatorischer Chemie synthetisiert sind, getestet werden. Für diese Zwecke benötigt die Pharmaindustrie neue Technologien, die im „high-throughput“ (Hochdurchsatz) Format erforderliche Tests ermöglichen.

Auch um die Wirkung bereits entwickelter Pharmaka zu verbessern ist es notwendig zu prüfen, inwieweit sie die Protein Kinasen und Phosphatasen Aktivitäten beeinflussen. Beispiel: Cyclosporin ist ein Immunsystemhemmer, ohne den keine Organtransplantationen möglich wären. Erst neuere Studien haben gezeigt, dass die Wirkungsmechanismen dieses Mittels durch die Hemmung von Protein Phosphatase PP2B funktioniert.

Zum Stand der Technik ist auszuführen.

Die an sich bekannte Biochip-Technologie ist ein sehr effizientes Verfahren, das die medizinische Diagnostik und die Entwicklung von Pharmaka revolutioniert. Mit Gen-Chips können z. B. komplette Transkriptionsmuster von Tumoren oder anderer Gewebe in einem Versuch erfasst werden. Die Entwicklung und Herstellung von Gen-Chips hat bereits ein fortgeschrittenes Stadium erreicht. Die veränderten Protein-Aktivitäten die, wie schon gesagt, die Ursache gravierender Krankheiten sind, können mit Hilfe von Gen-Chips nicht erforscht werden. Es ist daher notwendig, effiziente Protein-Chip-Technologien zu entwickeln. (Verfahren zur schnellen Auswertung veränderter Protein-Aktivitäten im Multidetektionsformat). Aufgrund der hohen Komplexität der Protein-Chip-Technologien, stehen diese Technologien gegenwärtig nur bedingt zur Verfügung.

Zum internationalen Stand der Technik:

Die aktuellen Nachweismethoden von Kinasen-Aktivitäten basieren typischerweise auf Messungen durch Einbau des radioaktiven Phosphats ^{32}P in Proteinsubstraten. Bei Anwendung dieser Methoden muss man sehr hohe Mengen von Radioaktivität für die Zellen verwenden, um den gesamten intrazellulären Pool von ATP zu markieren und die Radioaktivitätsmarkierung des Zielproteins zu sichern. Um die relative Phosphoryllierung des Zielproteins nachzuweisen, müssen nach der Inkubierung von Zellen mit Testsubstanzen die Zellen zerlegt und das Zielprotein gereinigt werden. Diese Methode benötigt große Mengen von Zellen, langen Inkubierungszeiten und vorsichtige Behandlungsverfahren, um falsche Phosphoryllierungs-Dephosphoryllierungsergebnisse zu vermeiden. Außerdem benötigt ein solches Verfahren die Reinigung des Zielproteins. Da die Endphosphoryllierung des Zielproteins sehr niedrig sein kann, hat dieses Verfahren einen schlechten Wirkungsgrad. Besonders schwerwiegend für Umwelt und Gesundheit ist der hohe Verbrauch von Radioaktivität, die diese Methode in den Hochdurchsatz-Versuchen („high-throughput“) notwendig macht.

Alternative Methoden zu Bestimmung von Kinasen Aktivitäten sind solche, die auf Phosphoryllierungsspezifischen Antikörpern basieren wie ELISA und Western Blots. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass es schwierig und sehr kostenintensiv ist, die Antikörper zu produzieren und zwischen phosphorylliertem und dephosphorylliertem Zustand des Proteins unterscheiden.

Die Massenspektrometrie (MALDI und ESI) wurde bereits vor über 15 Jahren zur Bestimmung von Primär Strukturen proteolysierter Protein-Fragmente angewandt. Theoretisch wäre die Massenauflösung dieser Methode für den Nachweis von Phosphoryllierungen mit Massendifferenz 80 Da ausreichend. Allerdings ist aufgrund der Instabilität der Phosphat-Bindung und deren schneller Abspaltung von Proteinresten während des Messverfahrens die Anwendung von MALDI-MS für den Phosphoryllierungsnachweis nur bedingt möglich. Oft führt die massenspektrometrische Detektierung der Proteinphosphoryllierung zu falschen negativen Ergebnissen. Darüber hinaus sind Massenspektrometer extrem kostenintensiv.

Aus dem Patent US 6,410,255 ist eine Methode bekannt, die es ermöglicht, Kinase-Aktivität nachzuweisen. Diese Methode betrifft einen Sensor, der eine fluoreszierende Gruppe darstellt, die in einem Polypeptid zusammen mit einem Kinase-spezifischen Abschnitt und einem Protease-empfindlichen Abschnitt eingebaut ist. Die Modifizierung der Proteine führt zu veränderter Zugänglichkeit der Spaltungsstelle der Proteasen und Abspaltung der fluoreszierenden Gruppe. Diese wird mit Hilfe von einem Fluoreszenzmikroskop detektiert. Zusätzlich zu Kinasen benötigt das Verfahren die Anwesenheit von Proteasen, zwischen deren Wechselwirkung möglicherweise zu Artefakten führen kann. Nachteilig sind die hohe Kosten von Fluoreszenzmikroskopen und die Notwendigkeit einer Fluoreszenzmarkierung des Zielpeptids.

Abgesehen von den bisher erläuterten Nachteilen beim Nachweis von Aktivitäten der Kinasen und Phosphatasen kann zusammenfassend bis hierher festgestellt werden, dass nur begrenzte Möglichkeiten von schnellen Nachweisen dieser Aktivitäten in miniaturisierten Probevolumen mit Tausenden von Komponenten bestehen.

Nun soll noch kurz auf die DE 100 51 252 A1 mit dem Titel „Bio-Chip“ eingegangen werden. Diese DE beschreibt ein Verfahren zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis eines Analyten, welcher polarisierende Moleküle, insbesondere in molekularer Form gelöste Biomoleküle, aufweist. Ein Sensor mit einer Vielzahl kleiner Messzellen ($< 1 \text{ mm } \varnothing$), die jeweils einen Kondensator darstellen, weist eine bestimmte Kapazität auf, soweit sich in den Messzellen ein Substrat befindet. Wird zusätzliches Material in der Form der nachzuweisenden Moleküle auf das Substrat gebracht, so ändert sich die Kapazität des Kondensators. Die Kapa-

zitätsänderung steht im Zusammenhang mit der Konzentration des Analyten. Probleme bei der Gewinnung genauer Messdaten werden beim Einbringen der bioaktiven Substanzen in die Messzellen gesehen. Weiterhin ist ein feinmechanisches System mit Federkontakten für das Auswerten mit entsprechender Messelektronik mitunter auch der Anlass für Messfehler. Eine rationelle Möglichkeit von schnellen Nachweisen ist nicht möglich. Diese Lösung gemäß DE 100 51 252 A1 stellt ein Bio-Chip für die Messungen von Proteinbindungen dar; der Nachweis der posttranslationalen Modifizierungsaktivitäten ist nicht möglich.

Es ist daher die Aufgabe der Erfindung, ein automatisiertes Verfahren zur Bestimmung posttranslationaler Aktivitäten vorzuschlagen, welches hochsensibel und unkompliziert funktioniert und virtuell für alle Kinase- und Phosphatase - Aktivitäten anwendbar ist. Es sollen keine Farbstoffe, keine fluoreszierenden oder radioaktiven Substanzen verwendet werden.

Durch schnelle Nachweise der posttranslationalen Aktivitäten und Tausenden von Komponenten soll ein wesentlicher Beitrag auf den Gebieten der Forschung und Entwicklung von Pharmaka, der Grundlagenforschung der Umwelttechnologie und molekularer medizinischer Diagnostik geleistet werden. Mit den entsprechenden Gerätesystemen erfolgt die Realisierung des Verfahrens.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe wie folgt gelöst, wobei hinsichtlich der grundlegenden Gedanken auf die Patentansprüche 1 verwiesen wird. Die weitere Ausgestaltung der Erfindung ergibt sich aus den Patentansprüchen 2 bis 9.

Zur Darlegung der Erfindung sind weitere Erläuterungen erforderlich.

Die technische Lösung ermöglicht den schnellen und effektiven Nachweis der posttranslationalen Aktivitäten in flüssigen Proben mit Analyten bzw. Enzymen, die auf Veränderungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften der jeweils verwendeten Sensoren basieren. Die flüssigen Proben sind die Proben aus Zellen oder die Proben mit Test-Substanzen, denen Enzyme hinzugegeben werden.

Die für den Nachweis der posttranslationalen Modifizierungsaktivitäten entwickelten Sensoren bestehen aus synthetisierten Proteinfragmenten bzw. Peptiden, die ein „Recognition Site“ für Protein, Kinasen oder andere Enzyme enthalten. Auf die schematische Darstellung derarti-

ger Sensoren wird im Zusammenhang mit den Erläuterungen zu den Ausführungsbeispielen eingegangen. Der „Recognition Site“ befindet sich zwischen zwei Gruppen der Aminosäurereste Moiety 1 und Moiety 2, die die Anzahl von Aminosäure Resten 0 bis n haben und eine Reihe von geladenen Resten besitzen. Der Sensor ist derart konstruiert, dass er eine 3-dimensionale (3-D) Struktur mit spezifischer Verteilung des molekularen elektrostatischen Potentials und ein molekulares Dipolmoment μ besitzt. Als Folge der o. g. posttranslationalen Aktivitäten wird ein Modifikationsrest innerhalb des Recognition Site umgewandelt. Dementsprechend wird die elektrostatische Potentialverteilung verändert und es ergibt sich das Dipolmoment μ^* des Sensors. Diese Veränderungen des Dipolmoments des Sensors werden mit Hilfe elektrischer oder optischer Methoden, wie das in den Ausführungsbeispielen noch erläutert wird, nachgewiesen.

Die folgende Tabelle 1 zeigt Beispiele von Sensoren, die zum Nachweis von Protein Kinase A (PKA), Protein Phosphatase 2B (PP2B), Tyrosin Kinase (TK), Tyrosin Phosphatase (TP) und Protein Kinase C (PKC) Aktivitäten verwendet werden können.

Tabelle 1: Primär Strukturen der Sensoren (Fettdruck zeigt Modifikationsreste, Kursiv-Recognition Site).

Moiety 1	Recognition Site	Moiety 2	Aktivität	Sensor Nr.
ELDVPIPGRFD	<i>RRVS</i>	VAAD	PKA	S1
ELDVPIPGRFD	<i>RRVpS</i>	VAAD	PP2B	S2
EI	<i>YETDYY</i>	D	TK	S3
EI	<i>pYETDpYpY</i>	D	TP	S4
EPEAVAEHG	<i>DKKS</i>	KKAKKER	PKC	S5

Die Entwicklung des Sensors mit gewünschter 3D-Struktur erfolgt durch molekulare Modellierung mit Hilfe von Bioinformatik-Methoden (z.B. Search in Swiss-Prot und PDB-Datenbanken, Optimierung der Struktur mit MOE oder SYBYL, Berechnung des molekularen elektrostatischen Potentials und des Dipolmoments der unmodifizierten und modifizierten Polypeptide). Hierzu wird verwiesen auf:

Brandt, W., Anders, A. and Vasilets, L. A. (2002) Predicted alterations in tertiary structure of the N terminus of the Na^+/K^+ -ATPase α subunit caused by acidic replacement or PKC-mediated phosphorylation of Ser-23. Cell. Biochem. Biophys. 37:83-95.

Beispiel: Das Dipolmoment des unphosphorylierten PKC-Sensors 5 (S5) lt. Tabelle 1 beträgt ca. 203 D, wobei die Phosphorylierung des Serins zur Orientierungsveränderung und Verminderung des Dipolmoments des Sensors auf 144 D führt.

Zusammenfassend ist bis hierher festzustellen:

Die Erfindung basiert auf den Nachweis der posttranslationalen Aktivitäten in einer flüssigen Probe auf Veränderungen physikalisch-chemischer Eigenschaften des Sensors ohne Markierung des Zielpeptides. Als Beispiel der experimentellen Verfahren zur Detektierung der Veränderungen des Dipolmoments des Sensors können die Messungen der Veränderungen der Dielektrizitätskonstante (Permittivität), Relaxationsströme, Brechzahl, Dichte oder Intensität des polarisierten Lichtes genannt werden.

Die Erfindung soll nunmehr anhand von Ausführungsbeispielen mit ergänzenden Hinweisen erläutert werden.

Die Figuren zeigen

- 1 - Schematische Darstellung eines Sensors
- 2 - Schematische Darstellung eines Gerätes zum Nachweis der posttranslationalen Aktivität mit Hilfe von optischen Messungen
- 3 - Nachweis der Peptidmodifizierung durch Messungen der relativen Dielektrizitätskonstante ϵ
- 4 - Nachweis posttranslationaler Modifizierungsaktivitäten mit Hilfe differenzieller Messungen
- 5 - Nachweis der Peptidmodifizierung durch Messungen der Frequenzverschiebung eines Oszillators

In der Figur 1 zeigen die Bezugszeichen:

- 1 - Reihe der Aminosäurereste (Moiety 1)

- 2 - Reihe der Aminosäurereste (Moiety 2)
- 3 - Verbindung
- 4 - Bindungsstelle
- 5 - Festkörper
- X - Modifizierungsreste

In der Figur 2 zeigen die Bezugszeichen

- 6 - Lichtquelle
- 7 - Polarisator
- 8 - Messzelle
- 9 - Lichtanalysator
- 10 - Lichtdetektor
- P - polarisiertes Licht

In Figur 3 A zeigt das Bezugszeichen

- 11 - Meßzelle

In Figur 4 A zeigen die Bezugszeichen

- 12 - Frequenzgenerator
- 13 - Messkondensator C1
- 14 - Messkondensator C2
- 15 - differenzieller Verstärker
- 16 - Wechselstrom/Gleichstrom-Wandler (AC/DC-Wandler)

Figur 1 ist der Sensor, welcher erfindungsgemäß ein synthetisiertes Polypeptid darstellt, der ein „Recognition Site“ für Protein Kinasen oder andere Enzyme enthält. Figur 1A zeigt die schematische Darstellung eines solchen Sensors. Der „Recognition Site“ mit einer oder mehreren Modifikationsresten X befindet sich zwischen zwei Gruppen der Aminosäurereste (Moiety 1 und Moiety 2), die eine Reihe von geladenen Resten besitzen. Die Moieties 1 und 2 sind zusammen mit dem Recognition Site derart aufgebaut, dass sie zu einer 3-dimensionalen (3-D) Struktur mit spezifischer Verteilung des molekularen elektrostatischen Potentials führen. Somit besitzt der Sensor ein molekulares Dipolmoment μ . Als Folge der o. g. posttranslationalen Aktivitäten wird ein Modifikationsrest X innerhalb des Recognition Site in X* um-

gewandelt. Somit werden die elektrostatische Potenzialverteilung und das Dipolmoment des Sensors μ^* verändert (Figur 1B). Diese Veränderungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Sensors werden mit Hilfe elektrischer oder optischer Methoden (siehe unten) nachgewiesen.

In einer Variante der Erfindung kann der Sensor mit Hilfe einer flexiblen Verbindung 3 und einer Bindungsgruppe (His-tag) an einem mit Ni-NTA Resin-beschichteten Festkörper 5 befestigt werden (Figur 1), die eine Glasoberfläche, eine Kunststoffkugel („bead“) oder ein Dielektrikum darstellt.

In einer anderen Variante der Erfindung kann der Sensor direkt an der mit Dielektrikum beschichteten Festkörperoberfläche synthetisiert werden.

In einer weiteren Variante kann der Sensor in molekulare Form Wasser gelöst sein.

Figur 2 zeigt eine schematische Darstellung einer Methode zum Nachweis der posttranslationalen Aktivitäten als Folge der Veränderungen optischer Eigenschaften der Probe mit dem Sensor. Eine Detektionszelle (Messzelle 8) mit einer flüssigen Probe und einem Sensor befindet sich zwischen einer Quelle des polarisierten Lichts \vec{P} und einem Lichtanalysators 9. Zwei dünne Glasplatten sind von innen mit einer Goldschicht und einem Dielektrikum überzogen. Diese dienen als Kontaktelektroden. Die Intensitätsveränderungen des detektierten Lichts ΔI sind proportional dem $\cos^2 \alpha$ (α ist der Rotationswinkel des polarisierten Lichts \vec{P}):

$$\Delta I \sim \cos^2 \alpha \quad (1)$$

In Abwesenheit der elektrischen Spannung sind die Dipolmoleküle des Sensors wegen thermischer Bewegungen zufällig orientiert. Das Feld E bewirkt eine partielle Ausrichtung der Dipole, denn es konkurriert mit der thermischen Bewegung der Moleküle, die nach Boltzmann-statistik eine Zufallsverteilung der Dipolorientierungen anstreben. Unter den üblichen Messbedingungen $\mu E \ll kT$ kann das mittlere Moment in Feldrichtung als:

$$\bar{\mu}_E / \mu \simeq \mu E / 3kT \quad (2)$$

berechnet werden, wobei μ ist Dipolmoment einzelner Moleküle, $\bar{\mu}_E$ – scheinbares mittleres Dipolmoment in Feldrichtung, E – Feldstärke, T – absolute Temperatur, $k = 1,3807 \cdot 10^{23} \text{ JK}^{-1}$. Da der Rotationsgrad des polarisierten Lichts proportional der optischen Aktivität einer Probe mit Sensor, die andererseits proportional der Anzahl der Moleküle in Feldrichtung ist, ergibt das:

$$\Delta I \sim \cos^2 \alpha \sim N = \bar{\mu}_E / \mu = \mu E / 3kT \quad (3)$$

Ändert sich das Moleküldipolmoment als Resultat einer posttranslationalen Aktivität, führt das zu Veränderungen der detektierten Lichtintensität.

Gemäß einer anderen Variante zum Nachweis der posttranslationalen Aktivitäten wird die Dielektrizitätskonstante (Permittivität) einer flüssigen Probe mit Sensor gemessen. Wie aus Figur 3 A ersichtlich, befindet sich die Probe in einer Detektionszelle (Messzelle 11), die als Kondensator dient. Durch Einbringen eines polarisierenden Dielektrikums zwischen die Platten eines Kondensators wird die elektrische Feldstärke im Vakuum E_0 auf P/ϵ_0 reduziert:

$$E = E_0 - P/\epsilon_0 \quad (4)$$

wobei $E_0 = E/\epsilon$, und P – ist induzierte Polarisation des Dielektrikums mit einer Dielektrizitätskonstante ϵ .

Das ergibt:

$$\epsilon = \epsilon_0 + P/E \quad (5)$$

Da Polarisation die Bedeutung eines Dipolmoments pro Volumeneinheit hat, ist P somit proportional dem scheinbaren mittleren Dipolmoment $\bar{\mu}_E$, der nach Gleichung (2) ist

$\bar{\mu}_E = \mu^2 E / 3kT$, das ergibt für ϵ :

$$\epsilon = \epsilon_0 + \mu^2 / kT \quad (6)$$

Wird ein Dipolmoment aufgrund einer posttranslationalen Modifikation geändert, führt es zu Veränderungen der Dielektrizitätskonstante nach Gleichung (6).

Werden die Sensormoleküle (s) in Wasser (w) oder anderen Lösungsmitteln gelöst, muss die Molpolarisation von diesen berücksichtigt werden:

$$P = P_w \cdot x_w + P_s \cdot x_s \quad (7)$$

wobei x_S Molenbruch von Sensor $x_S = n_S / (n_W + n_S)$ und x_W ist Molenbruch von Wasser $x_W = n_W / (n_W + n_S)$.

Figur 3 B zeigt ein Beispiel der Veränderungen der Dielektrizitätskonstante für zwei synthetisierte Modellpeptide S1 und S2 (Tabelle 1).

Die in Wasser gelösten Polypeptide (S1) oder (S2) sind als Dielektrikum zwischen den Elektrodenplatten des Messkondensators (Messzelle 11), siehe Figur 3A, angebracht. Polypeptid ELDVPIPIGRFD~~RR~~/SVAAD (S1) ist ein spezifisches Substrat für Protein Kinase A, die Phosphoryllierung des Serins katalysiert. Die Dephosphoryllierung des Serins des Polypeptids ELDVPIPIGRFD~~RR~~/pSVAAD (S2) erfolgt durch Phosphatase PP2B. Die Dielektrizitätskonstante des unphosphorylierten Polypeptides (S1) ϵ_3 beträgt 76, wobei diese des phosphorylierten Polypeptides (S2) auf 70 reduziert ist. Somit ermöglichen diese Verfahren die Aktivitäten dieser Enzyme nachzuweisen.

Zum Nachweis der Peptidmodifizierung im Versuch durch die Messungen der relativen Dielektrizitätskonstante ϵ ist noch zu ergänzen: Vier μ l von Proben mit jeweils Polypeptid S1 (unphosphoryliert) oder S2 (phosphoryliert) (Tabelle 1), die in H₂O in Konzentration 1.14 mM gelöst sind, werden unmittelbar zwischen die Elektrodenplatten eines Messkondensators eingetragen. Die Messungen der Dielektrizitätskonstante ϵ erfolgen bei einer Temperatur $t=23^\circ\text{C}$. Im vorliegenden Beispiel sollten die niedrigsten Probevolumen nicht unter 4 μ l liegen. Die Proteinkonzentrationen müssen sich im Millimolarbereich befinden, das kann die Verwendung dieser Messverfahren für Biochips einschränken.

Um die Verwendung dieser Messverfahren für Biochips zu ermöglichen, wurden differenzielle Kapazitätsmessungen entwickelt, die das Probevolumen unter 0,5 μ l sowie die Proteinkonzentrationen auf 10^{-5} M reduzieren. Die Figuren 4 A und 4 B zeigen die Ergebnisse solcher differenziellen Messungen. Besonders vorteilhaft ist die hohe Zeitauflösung dieser elektrischen Messungen, die im ms-Bereich liegt und hauptsächlich von der Schnelligkeit der Probeeintragung abhängig ist. Somit ermöglichen diese Verfahren nicht nur Modifizierungsaktivitäten in kleinen flüssigen Proben nachzuweisen, sondern auch deren Kinetik zu registrieren.

Bezüglich des Aufbaus des Gerätes für differenzielle Messungen wird auf Figur 4 A verwiesen. Das Messgerät besteht aus dem Frequenzgenerator 12, den Messkondensatoren 13, 14, die in einer Chip-Platte integriert sind, dem Verstärker 15 und dem Wechselstrom/Gleichstrom-Wandler (AC/DC-Wandler) 16. Die Amplitude des Ausgangssignals, die proportional zur Differenz der Kapazitäten der Messkondensatoren 13 und 14 ist, wird in eine Gleichspannungsdifferenz mit Hilfe von AC/DC-Wandler ΔU umgewandelt. Diese wurde und mit Hilfe eines Schreibers registriert (s. Figur 4B und 4C) oder mit Hilfe eines Analog / Digitalwandlers auf eine digitale Auswertung nachgeschaltet.

Figur 4 B zeigt die differenziellen Messungen mit Sensoren für Protein Kinase A Aktivität: ELDVPIPIGRFDRRFSVAAD (S1) und Phosphatase PP2B-Aktivität: ELDVPIPIGRFDRRVPsVAAD (S2).

Figur 4 C zeigt die differentiellen Messungen mit den Sensoren für Tyrosin Kinase-Aktivität ElYETDYYD (S3) und für Tyrosin Phosphatase-Aktivität ElpYETDpYpYD (S4).

Alle Sensoren sind in H₂O bei einer Konzentration von 20 μ M gelöst und entweder in Messkondensator C1 13 oder in C2 14 aufgetragen (siehe Beschriftung). Die Probenvolumen betragen 0,5 μ l. Alle Messungen sind bei Raumtemperatur durchgeführt.

Gemäß einer weiteren Variante der Verfahren zum Nachweis der posttranslationalen Aktivitäten sind die in Wasser gelösten Polypeptide (S1) oder (S2) als Substrate in einer Messzelle angebracht, welche die Induktivität L und Kapazität C besitzt und als Oszillator dient (Figur 5). Die Frequenz ω des Oszillators lässt sich durch $\omega = 1/LC$ bestimmen, die mit hoher Genauigkeit (10^{-5}) gemessen sein kann. Es ist eine deutliche Verminderung der Frequenz zu sehen, wenn die Probe anstatt eines unphosphorylierten Polypeptid S1 ein phosphoryliertes Polypeptid S2 beinhaltet (Figur 5).

Zum Nachweis der Peptidmodifizierung durch Messungen der Frequenzverschiebung eines Oszillators wurde im Versuch wie folgt vorgegangen:

Ein Röhrchen mit 150 μ l von Proben mit unphosphorylierten Peptid S1 oder phosphorylierten Peptid S2 (Konzentration 1,14 mM in H₂O) ist als Kern in einer Induktionsspule eines Oszillators platziert. Die Frequenz f ist bei Temperatur t = 22 °C gemessen, $f_0 = 5342,9$ kHz.

Die Peptidmodifizierung lässt sich auch durch Messungen des Brechungsindex ermitteln. Nach einer Maxwell'schen Theorie des Magnetismus besteht zwischen der Dielektrizitätszahl und bei gleicher Frequenz gemessenen Brechungsindex n die Beziehung:

$\epsilon = \epsilon/\epsilon_0 = n^2$. Das ermöglicht die durch posttranslationalen Aktivitäten induzierte Veränderungen des molekularen Dipolmoments durch Veränderungen des Brechungsindex:

$$n = (1 + \mu^2/kT \epsilon_0)^{1/2} \quad (8)$$

zu detektieren.

Da die flüssigen Proben aus den Zellen oder Organismus sehr kompliziert sind und viele Proteine und kleinere polarisierende Moleküle besitzen, führt das zur großen Variabilität der o.g. physikalisch-chemischen Eigenschaften solcher Proben. Um die posttranslationalen Aktivitäten in komplizierten flüssigen Proben nachzuweisen, ist es wichtig, differenzielle Messungen durchzuführen. Dielektrizitätskonstante, Brechungsindex oder Lichtintensität können z.B. als Differenz zwischen Proben mit und ohne Sensor oder vor und nach einer Inkubierung mit einem Sensor detektiert werden.

Abschließend ist zusammenzufassen:

Das o. g. Verfahren zum Nachweis posttranslationaler Modifizierungsaktivitäten ermöglicht den Nachweis der Protein Kinasen- und Phosphatasen-Aktivitäten unter Verwendung der vorher erläuterten Gerätesysteme in einer Lösung mit einem losen oder befestigten Sensor bzw. Proteinfragment.

Durch differentielle Kapazitätsmessungen der posttranslationalen Modifizierungsaktivitäten, die in modifiziertem und nichtmodifiziertem Zustand unterschiedliche molekulare Dipolmomente besitzen, lassen sich die Probenvolumen unter 0,5 μl sowie die Sensor-Peptidkonzentrationen auf 10^{-5} M reduzieren. Somit ermöglichen diese Verfahren die Bestimmung mehrerer Modifizierungsaktivitäten in miniaturisierten Probenvolumen und eine Registrierung deren Kinetik.

Die entwickelte Elektronik für differenzielle Kapazitätsmessungen ermöglicht eine effektive unkomplizierte, schnelle und kostengünstige Detektierung posttranslationaler Modifizierungsaktivitäten.

Der Anwendungsbereich der Erfindung erstreckt sich auf die Pharma-Industrie, (große und mittlere Pharma-Unternehmen), medizinische Diagnostik und Grundlagenforschung und auf Biotechnologie-Unternehmen mit der Zielstellung:

- Verbesserung und Optimierung von Hochdurchsatz-Testreihen für neusynthetisierte und bereits vorhandene Verbindungen
- Untersuchung deren hemmender Wirkung auf Protein Kinasen- und Phosphatasen- Aktivitäten in vorklinischen Studien.

Als Besonderheiten des erfindungsgemäßen Verfahrens sind hervorzuheben:

- Die Möglichkeit der Kinetikmessungen mehrerer posttranslationaler Modifizierungsaktivitäten
- Voraussetzungen zur Messung sehr instabiler Modifizierungen wie Phosphoryllierung der Histamin und Arginin Aminosäure-Reste wurden geschaffen.

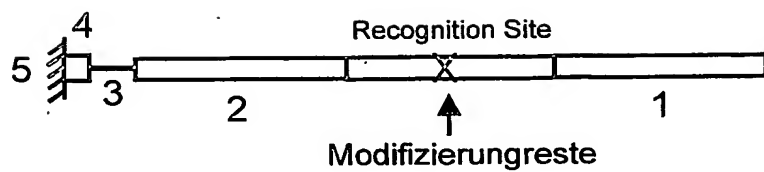
Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis posttranslationaler Modifizierungsaktivitäten, dadurch gekennzeichnet, dass im Sinne eines Sensors Proteinfragmente bzw. Polypeptide hergestellt werden, welche aus Aminosäureresten (Moieties 1, 2) bestehen, die eine Reihe von geladenen Resten besitzen, und einer Recognition Site, welche Modifizierungsreste(n) (X) beinhaltet und eine molekulare elektrostatische Potentialverteilung aufweisen, wobei die elektrostatische Potentialverteilung als Dipolmoment gemessen wird, dem Sensor die Enzyme hinzugegeben werden, eine erneute Messung des Dipolmoments erfolgt und eine Veränderung des elektrostatischen Potentials und damit des Dipolmoments ein Nachweis der posttranslationalen Modifizierungsaktivitäten darstellt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäurereste (Moieties 1, 2) eine Anzahl von 0 bis n haben und eine Reihe von geladenen Resten besitzen.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Recognition Site mit dem Modifizierungsrest (den Modifizierungsresten) (X) eine Erkennungsgruppe darstellt, die Umwandlung des Modifizierungsrestes nur durch spezifische Protein Kinase oder Phosphatase ermöglicht.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäurereste (Moieties 1, 2) zusammen mit der Recognition Site und Modifizierungsrest (den Modifizierungsresten) (X) eine 3D-Struktur mit herstellerseitig vorgegebener Verteilung des molekularen elektrostatischen Potentials und molekularen Dipolmoment aufweisen.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die synthetisierten Proteinfragmente entweder in einer Lösung gelöst sind oder an einem Festkörper (5) platziert sind.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Veränderung der molekularen elektrostatischen Potentialverteilung des Proteinfragments als Folge der posttranslationalen Modifizierungsaktivitäten gemessen wird, indem die elektrostatische Potentialverteilung in eine andere physikalische Maßeinheit umgerechnet und als sol-

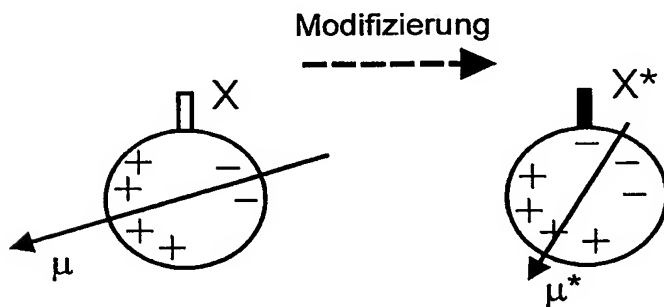
che ausgewiesen wird und die elektrostatische Potentialveränderung in der veränderten Größe der anderen physikalischen Maßeinheit gemessen bzw. aufgezeichnet wird.

7. Verfahren nach Anspruch 1 und 6, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Basis einer differentiellen Kapazitätsmessung die posttranslationalen Modifizierungsaktivitäten ermittelt werden, indem die Veränderung als ΔU gemessen bzw. aufgezeichnet wird.
8. Gerätesystem nach Anspruch 1, 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, dass zur Bereitstellung differenzieller Messergebnisse geeignete Messeinrichtungen als Bestandteile des Gerätesystems die Differenz der Veränderungen ermitteln und diesen gegebenenfalls ein differenzieller Verstärker (15) nachgeschaltet und danach ein Wechselstrom/Gleichstrom-Wandler (16) angeordnet ist.
9. Gerätesystem zur Realisierung des Verfahrens nach Anspruch 1, 6, 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, dass die im Ergebnis der Modifizierungsaktivitäten erfolgten Veränderungen durch an sich bekannte Bauteile in analoge physikalische Messergebnisse umgewandelt werden, und diesen Bauteilen ein Analog/Digitalwandler im Hinblick auf die digitale Auswertung nachgeschaltet ist.

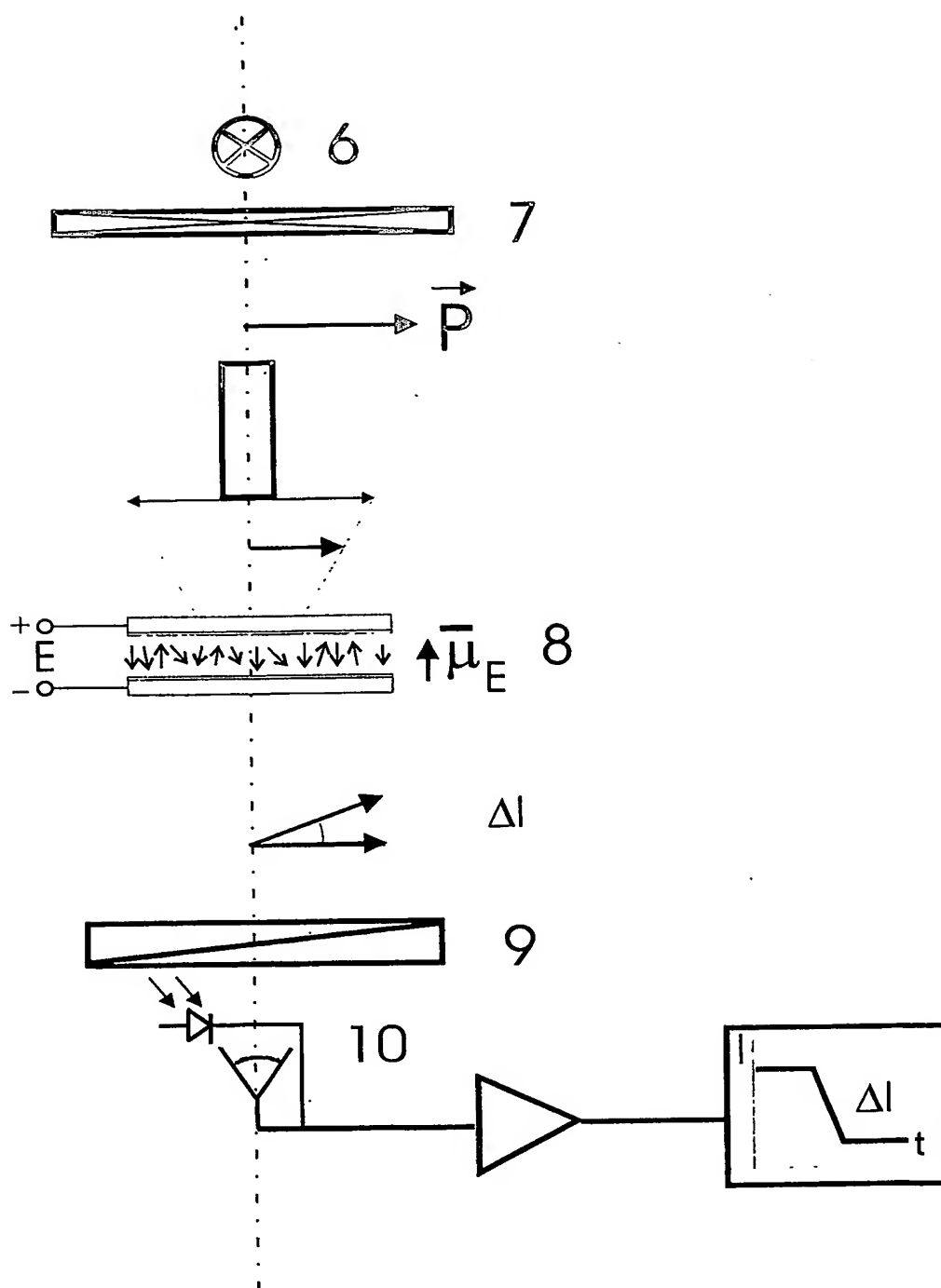
A



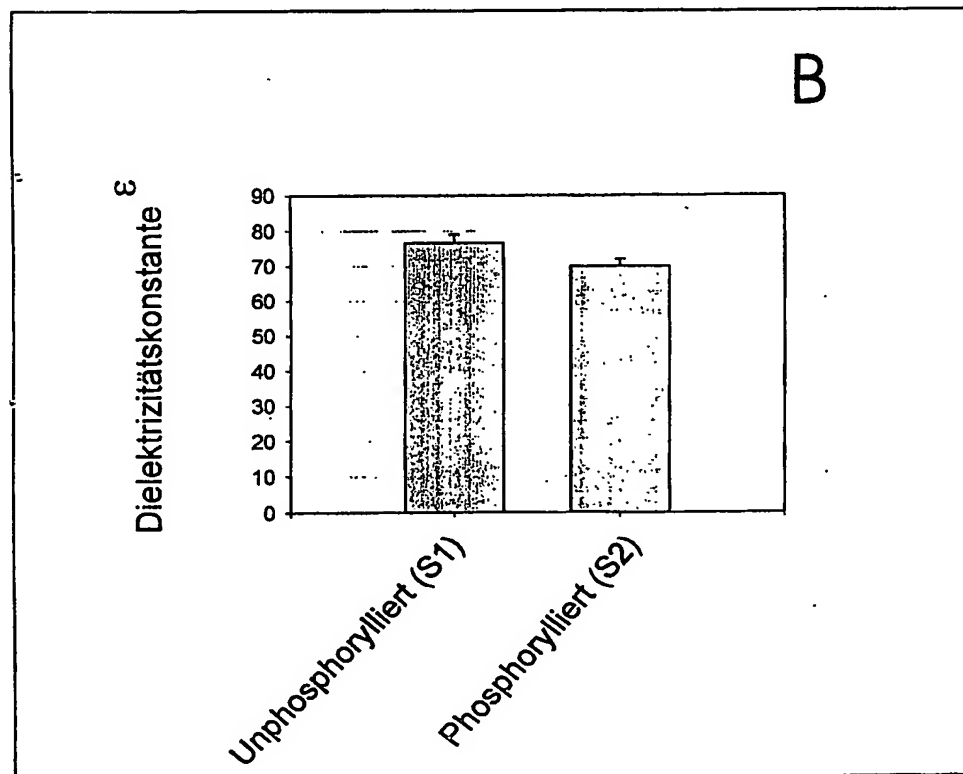
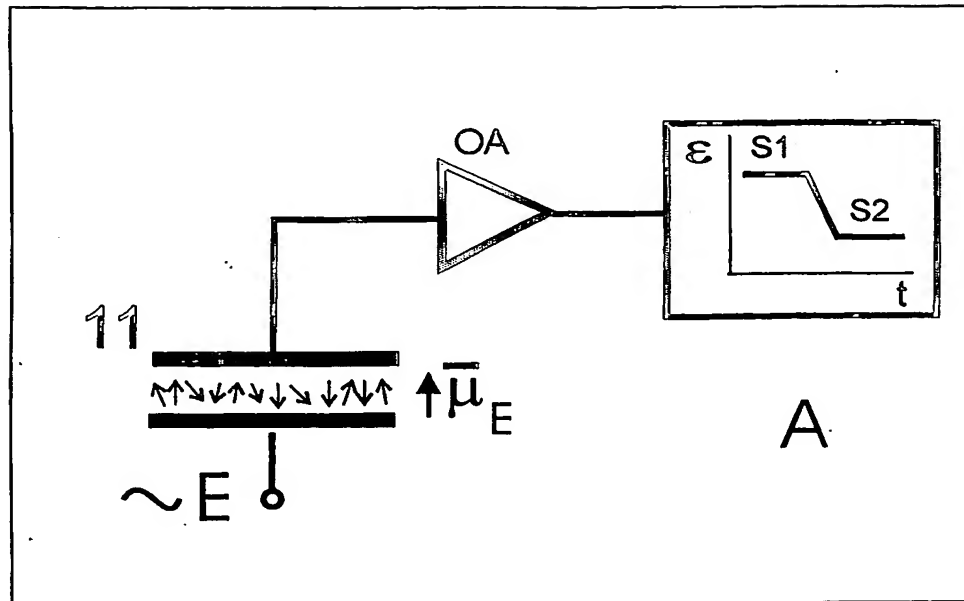
B



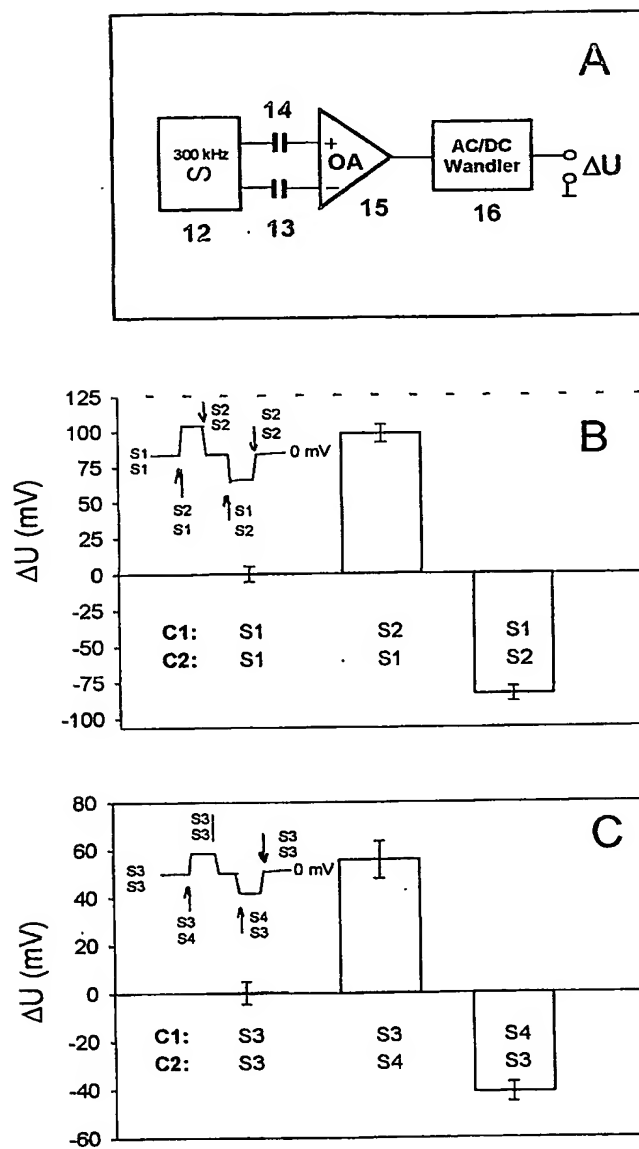
Figur 1



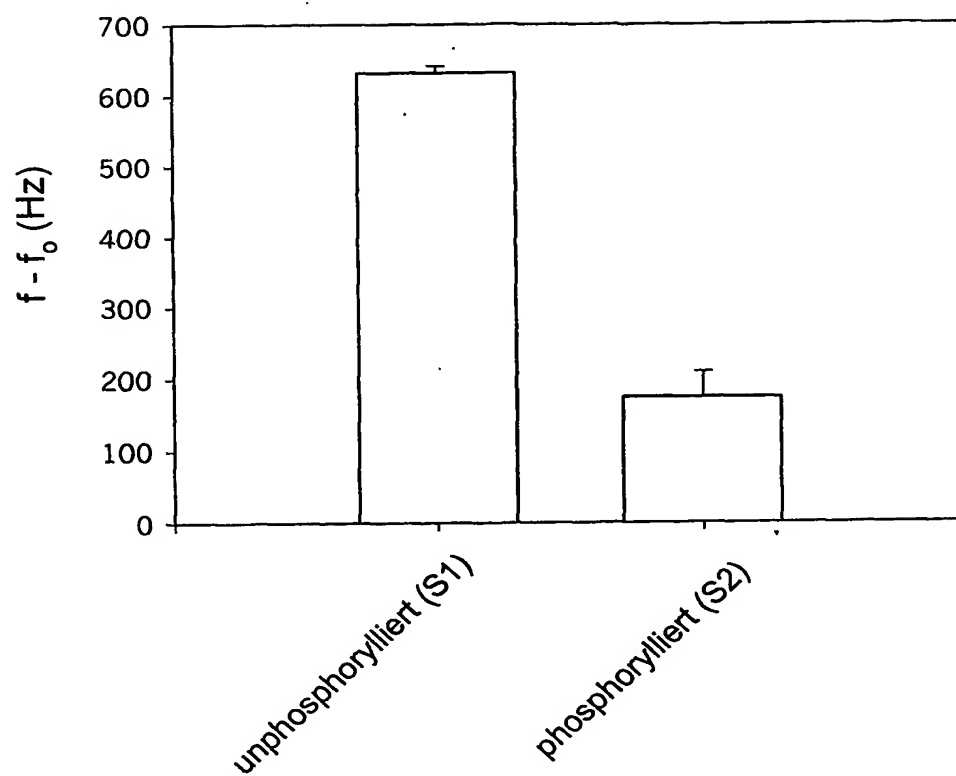
Figur 2



Figur 3



Figur 4



Figur 5

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Oktober 2004 (14.10.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/087946 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/573,
33/543

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VASILETS, Larissa
[RU/DE]; Lessingstrasse 10, 06179 Teutschenthal (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2004/000674

(74) Anwalt: VOIGT, Wolf-Rüdiger; Alter Markt 1-2, 06108
Halle (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
30. März 2004 (30.03.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

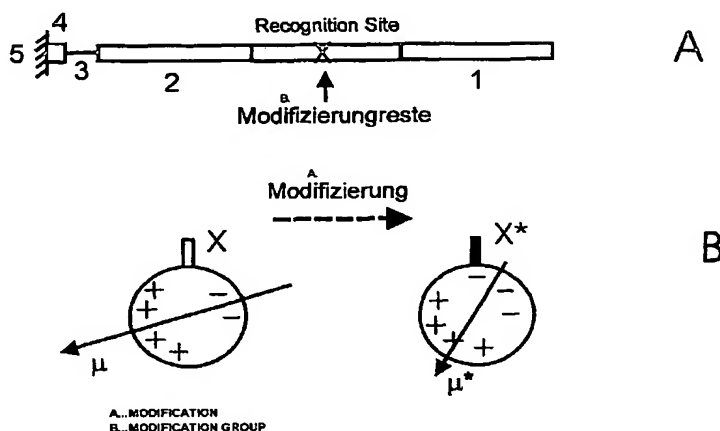
(30) Angaben zur Priorität:
103 14 965.1 2. April 2003 (02.04.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): BIOSCORA GMBH [DE/DE]; Deutscher Platz 5 c,
04103 Leipzig (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE DETECTION OF POST-TRANSLATIONAL MODIFICATION ACTIVITIES AND DEVICE
SYSTEM FOR CARRYING OUT SAID METHOD

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS POSTTRANSLATIONALER MODIFIZIERUNGSAKTIVITÄTEN UND
GERÄTESYSTEME ZUR REALISIERUNG DES VERFAHRENS



(57) Abstract: The invention relates to a method for the qualitative detection of post-translational modification activities in a small liquid sample from organism cells or test chemicals. Phosphorylation/dephosphorylation of proteins by kinases and phosphatases is an example of a post-translational modification. The method is characterised in that protein fragments or polypeptides are synthesised as sensors. The above comprise the part chains (1) and (2), containing charged amino acid groups and a recognition site with one or more modification group(s) (X). The sensor has a specific electrostatic potential distribution and a dipole moment. A modification of the sensors occurs on addition of enzymes, associated with a shift in the molecular electrostatic potential distribution and a change in the dipole moment. The potential shift is a determinator for post-translational modification activity. Several device systems are disclosed for the practical carrying out of the method. The method provides a rapid, highly sensitive and effective method for the detection of various types of post-translational activity, in particular, suitable for biological multi-detection systems (biochips and high throughput screening) and finds application in particular to the development of pharmaceuticals, medical diagnostics, basic research and environmental protection.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:**

12. Mai 2005

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum qualitativen Nachweis der posttranslationalen Modifizierungsaktivitäten in einer kleinen flüssigen Probe aus Zellen des Organismus oder mit Test-Chemikalien. Als Beispiel einer posttranslationalen Modifizierung sei die Phosphorylierung-Dephosphorylierung der Proteine durch Kinasen und Phosphatasen genannt. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass im Sinne eines Sensors Proteinfragmente bzw. Polypeptide synthetisiert werden. Diese bestehen aus den Teilketten 1 und 2, welche geladene Aminosäurereste enthalten und eine Erkennungsstelle, welche einen oder mehreren Modifizierungsrest(e) (X) besitzt. Somit besitzt der Sensor eine spezifische elektrostatische Potentialverteilung und ein Dipolmoment. Durch Zugabe von Enzymen erfolgt eine Modifizierung des Sensors, was mit Verschiebung der molekularen elektrostatischen Potentialverteilung und Veränderung des Dipolmoments verbunden ist. Die Potentialverschiebung ist ein Nachweis der posttranslationalen Modifizierungsaktivitäten. Verschiedene Gerätesysteme werden zur praktischen Umsetzung des Verfahrens vorgeschlagen. Die Erfindung stellt ein schnelles, hochempfindliches und effektives Verfahren zum Nachweis der verschiedenen Typen der posttranslationalen Aktivitäten dar, das besonders im Bereich der biologischen Multidetektionssysteme (Biochips bzw. "high-throughput screening") geeignet ist und wird hauptsächlich bei der Entwicklung von Pharmaka, medizinische Diagnostik. Grundlagenforschung und Umweltschutz zur Anwendung kommen.